

Studies on Binding of Naphthyridines and Pteridines to Abasic Sitecontaining DNA Duplex and Their Application to Gene Analysis

著者	岱 青
号	49
学位授与番号	2269
URL	http://hdl.handle.net/10097/39320

氏 名・(本 籍)	ダイ 岱	セイ 青
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)	
学 位 記 番 号	理 博 第 2 2 6 9 号	
学位授与年月日	平 成 1 8 年 3 月 2 4 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
研 究 科, 専 攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 化学専攻	
学 位 論 文 題 目	Studies on Binding of Naphthyridines and Pteridines to Abasic Site-containing DNA Duplex and Their Application to Gene Analysis (脱塩基部位含有二重鎖DNAとプテリジン・ナフチリジン類の相互作用解析と遺伝子分析への応用)	
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 寺 前 紀 夫 教 授 山 下 正 廣, 斎 藤 絃 一 講 師 西 澤 精 一	

論 文 目 次

Chapter 1	Introduction
Chapter 2	Detection of single-nucleotide deletion by using a H-bonding ligand in combination with AP site containing DNA
Chapter 3	Improvement of sensing property of ligand for G-recognition: Introduction of methyl groups
Chapter 4	Improvement of sensing properties of ligand for G-recognition: Control of flanking bases of AP site
Chapter 5	Development of fluorescence ligands for Thymine-recognition
Chapter 6	General Conclusions

論 文 内 容 要 旨

【第一章】近年、薬剤の感受性や疾患の原因となる多数の遺伝子変異が報告されています。遺伝子変異検出法として、ハイブリダイゼーションや酵素等に基づくDNAチップ等が挙げられるが、蛍光ラベル化等の化学修飾や精密な温調制御、また、特殊な酵素を必要とする点などが改善すべき課題として指摘されている。そこで、当研究室では、全く新しいアプローチとして、AP site形成と蛍光性小分子リガンドを併用するSNPs検出法を提案している。本法ではAP siteを含むプローブDNAを用いることにより、意図的にDNA二重鎖中にAP siteを構築し、その空間においてAP siteの向側の標的塩基を蛍光性リガンドが認識する。これまでに、シトシン選択性の2-amino-7-methylnaphthyridine (AMND)やグアニン選択性の2-amino-4-oxopteridine (pterin)等を開発しており、これらのリガンドを用いることにより、SNP s(single-nucleotide polymorphisms) の検出が可能であることを見出している。このSNPs検出システムを実用レベルへと発展させるには、高い塩基選択性と強力な認識機能を有するリガンドの開発が必要となる。そこで、本研究

では、脱塩基部位含有二重鎖DNAとプテリジン・ナフチリジン類の相互作用解析と遺伝子分析への応用について検討した。つまり、AP site形成と蛍光性小分子リガンドを併用するSNPs検出法を一塩基欠損検出へ展開し、一塩基欠損アレル検出方法を開発した。また、メチル基導入およびAP site上下塩基の制御によりグアニン検出プローブの認識機能を改善するとともに、新しくチミン選択性を有する蛍光性リガンドの開発を行った。

【第二章】本研究では、AP site形成と蛍光性小分子リガンドを併用するSNPs検出法を一塩基欠損検出へ適用し、シトシン選択性のAMNDを用いて、シトシン欠損検出を行った。DNA二重鎖存在下と非存在下でのAMNDの蛍光スペクトルを測定した結果、DNA非存在下でのAMNDの蛍光スペクトルに対し、一塩基欠損DNA存在下では、殆どスペクトル変化が見られず、正常DNAの存在下では、著しい蛍光消光が見られることが分かる。これは、正常DNAでは、AP site形成により、リガンドが標的塩基と結合するのに対し、変異DNAでは、標的塩基の欠損により、バルジ構造を形成するためリガンドが結合できないためと考えられる。DNA二重鎖融解温度 (T_m) 測定でも、AMND添加前後における T_m は正常DNA存在時だけに著しく増加するのが見られ、この結果と一致した。さらに、この系をConnexin 26遺伝子のdel35G変異検出へ適用した結果、欠損の有無を簡便に蛍光検出できることが分かった。以上の結果を踏まえて、さらに一塩基欠損アレル検出法の開発を試みた。ここでは、連続した二つのAP siteを有するプローブDNAを用いることに着目した。連続した二つのAP siteを有するプローブDNAとAMNDを用い、それぞれ正常ホモ、欠損ホモやヘテロDNA存在時の温度上昇による蛍光強度変化を測定し、得られた蛍光強度曲線を温度に対して一次微分した。その結果、正常と変異ホモの場合、それぞれ低温側と高温側で極大ピークがみられた。正常ホモの場合、連続した二つのAP siteの空間がAMNDに対して大きすぎるため、準安定な錯形成をし、低温で蛍光回復が見られたと考えられる。一方、変異ホモの場合、一塩基欠損により、比較的小さな空間が形成されることにより、AMNDと安定な錯形成をし、高温で蛍光回復が見られたと考えられる。また、ヘテロの場合は、正常ホモと変異ホモに対応する二つのピークが見られ、ピークの形状から、アレル検出が可能であった。また、 T_m の結果との比較により、蛍光回復温度は T_m と関係があることが分かり、プローブDNAの融解温度の調整が明確な応答を得る上で重要であることが分かった。この方法を実配列 (del35G) へ適用したところ、プローブDNAの最適化により、明確なアレル検出が可能であった。以上のように、DNAのAP site形成と小分子リガンドを併用する方法により、一塩基欠損検出が可能であり、さらに連続した二つのAP siteを有するプローブDNAとAMNDを利用することにより、一塩基欠損アレル検出法を開発した。

【第三章】これまでにpterinがグアニン選択性を示すことが見出されているが、その結合親和性は弱く、PCR産物への適用にはさらなる高認識機能を有するプローブ分子の開発が必要となる。本研究ではメチル基がスタッキングを強くする効果に着目し、グアニン選択性を有する蛍光性小分子pterinにメチル基を二個導入した2-amino-6, 7- dimethyl-4-pteridine (diMe-pteridine)について検討した。AP siteの向側のターゲット塩基を変化させてdiMe-pteridine添加前後における蛍光測定を行った結果、diMe-pteridineはグアニン選択性を示し、強い蛍光消光応答を示した。また、算出したdiMe-pteridineとGとの結合定数は、pterinの場合よりも十倍大きくなり、この結果はカロリーメトリーによる測定結果と一致した。熱力学的パラメータから、diMe-pteridineの認識機能が強くなった原因はエントロピーの由来によるものであり、これはメチル基の疎水性によりdiMe-pteridineとAP siteの上下塩基とのスタッキングが強くなったことを示唆する。各種のAP site上下塩基の影響を調べた結果、diMe-pteridineは殆どの塩基配列に適用できることを見出した。さらに、PCR増幅したK-ras遺伝子の一塩基多型の検出にdiMe-pteridineを適用したところ、顕著なG選択

的蛍光応答が得られた。以上の結果から、diMe-pteridineとAP siteを有するオリゴヌクレオチドを用いることにより、Gに関連した一塩基多型を簡便に検出できることが分かった。

【第四章】 AP site上下塩基の制御に基づく認識機能の向上に着目し、G-A mismatches塩基対を導入することによる認識機能の向上について検討した。AP siteの3'側と5'側にA-G mismatches塩基対を導入したDNA二重鎖添加によるdiMe-pteridineの蛍光消光率を調べた結果、AP siteの3'側に mismatches塩基対を導入することにより、より効果的な蛍光消光が見られた。5'-GGT-3' / 3'-CXA-5' (フルマッチ) と5'-GGT-3' / 3'-AXA-5' (ミスマッチ) 配列を用いた検討では、 mismatches塩基対形成を利用することで結合定数が約10倍増加することが分かった。熱力学的パラメーターの検討から、結合定数の増加はエンタルピー由来であり、スタッキング相互作用がより効果的になっていることが示唆された。以上のように、AP site上下塩基の制御により、認識機能の最適化が可能であることを見出した。

【第五章】 これまでに、riboflavinがチミン選択性を示すことが見出されているが、その選択性は不十分なものであり、より優れたチミン検出プローブの開発が必要であった。本研究では、チミンと三点水素結合し、DNAのリン酸部位と水素結合しうるグアニジニウム基を有するAmilorideがチミンに対して高選択性並びに高親和性を発現することを見出し、実用レベルのチミン検出リガンドの開発を達成した。

【第六章】 第二章では、AP site形成と蛍光性小分子リガンドを併用することにより、一塩基欠損の有無を簡便に蛍光検出できることを見出した。さらに連続した二つのAP siteを有するプローブDNAを利用することにより、一塩基欠損アレル検出法を開発した。第三章では、メチル基がスタッキングを強くする効果に着目し、メチル基導入により、グアニン検出リガンドの認識機能を向上させ、実用レベルのグアニン検出リガンド開発を達成した。第四章では、AP site上下塩基の制御に基づく認識機能の向上に着目し、AP siteの3'側にA-G mismatches塩基対を導入することにより、グアニン認識機能の向上を達成した。第五章では、チミンと三点水素結合し、DNAのリン酸部位と水素結合しうるグアニジニウム基を有するAmilorideがチミンに対して高選択性並びに高親和性を発現することを見出した。これらの結果は、AP siteを反応場とした水中での核酸塩基認識システムの構築に深い意味であり、さらにそれに基づく遺伝子変異検出法を実用レベルへと発展させるには重要な役割を果たしたものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、脱塩基部位含有二重鎖DNAとプテリジン・ナフチリジン類の相互作用解析と遺伝子分析への応用について検討している。ポストゲノム時代の重要な課題である遺伝子変異分析に対して、AP site 含有DNA 二重鎖を用いた分析法の汎用化と実用化を達成するため、一塩基欠損検出法の構築、核酸塩基認識試薬の開発及びその認識機能の改善を目的としている。

第一章では、一塩基置換の検出法に関する研究の現状についてまとめている。

第二章では、AP site形成と蛍光性小分子リガンドを併用するSNPs検出法を一塩基欠損検出へ適用し、欠損の有無を簡便に蛍光検出できることを見出している。さらに、連続した二つのAP siteを有するプローブDNAを用いることに着目し、新たな一塩基欠損アレル検出法の構築を達成している。この検出法では、一本のプローブDNAと一つのリガンドを用いることにより、一塩基欠損アレル検出が可能であることを見出し、安価かつ簡便な一塩基欠損検出法として期待できる。

第三章では、メチル基がスタッキング相互作用を強くする効果に着目し、グアニン選択性の蛍光性小分子にメチル基を導入することにより、認識機能を十倍向上させた。その結果、PCR 増幅したK-ras遺伝子の一塩基多型の検出に顕著なG選択的蛍光応答が得られ、実用レベルのグアニン検出リガンド開発を達成している。

第四章では、AP site上下塩基の制御に基づく認識機能の向上に着目し、AP site の3' 側にA-Gミスマッチ塩基対を導入することにより、グアニン認識機能の向上を達成している。その結果、 10^{-7} Mレベルの結合親和性が発現され、AP siteの上下塩基対をミスマッチ塩基対に置換することによる認識機能の向上が可能であることを見出している。

第五章では、チミンと三点水素結合し、DNAのリン酸部位と水素結合しうるグアニジニウム基を有するAmilorideがチミンに対して高選択性並びに高親和性を発現することを見出し、実用レベルのチミン検出リガンドの開発を達成した。

以上の研究成果は論文提出者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、岱青君提出の博士論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。